



DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

MAESTRIA EN GESTION DE LA CALIDAD Y

SEGURIDAD ALIMENTARIA

***“Estudio Preliminar de Aerobios Mesófilos en la leche cruda
que se expende en carros repartidores en la ciudad de
Cuenca”***

TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO

“MAGISTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD

ALIMENTARIA”

AUTOR: JENNY MARCELA ROJAS PESÁNTEZ

DIRECTOR: CLAUDIO SÁNCHEZ JAUREGUI

CUENCA- ECUADOR

2013

DEDICATORIA

A Dios que me ha dado la oportunidad de culminar con éxito una etapa más en la vida

A mis padres pilar fundamental, siempre he contado con su apoyo incondicional

A mi hija María Andrea mi mayor tesoro, motor y razón de mi vida

A mi angelito Matías Alejandro siempre te llevo en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Piercósimo Tripaldi por su apoyo en la parte estadística del proyecto.

Al Ing. Claudio Sánchez por la orientación para el desarrollo de éste trabajo

A Genaro Pinos por su paciencia y colaboración en el desarrollo de éste trabajo

A todo el personal de La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro de manera especial al Dr. Luis Ayala por la gestión y el apoyo brindado para la toma de muestras.

A los amigos que apoyaron y de manera especial a la Ing. María Fernanda Rosales responsable del laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay por la apertura durante la elaboración del proyecto.

RESUMEN

El presente estudio tiene por objetivo determinar el número de aerobios mesófilos en leche cruda muestreada en los carros recolectores del producto en las zonas de Tarqui, Tutupali, Victoria del Portete y alrededores y que serán comercializadas en la ciudad de Cuenca con el fin de verificar si la leche es apta para el consumo humano. Se analiza si la carga microbiana presente es inferior a $1,5 \times 10^6$ UFC/ml valor estipulado por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2012 Quinta Revisión, para Leche Cruda. El muestreo se realizó por duplicado a 41 carros repartidores en fechas distintas generando un total de 82 muestras. El estudio determina las medias de pH y temperatura con que es transportada la leche, análisis de varianza de la carga microbiana por zona de recolección y usando el método de K-means se establece la correlación que existe entre variables independientes y dependiente. Los datos y resultados son reportados en éste estudio.

Palabras claves:

Aerobios mesófilos, pH, temperatura, UFC, metabolismo.

ABSTRACT

The goal of the present study is to determine the number of mesophilic aerobic micro-organisms in samples of raw milk in the trucks that transport the product from the areas of *Tarqui*, *Tututpali*, *Victoria del Portete*, and the surrounding areas. The purpose is to verify if the milk is fit for human consumption. We analyze if the microbial load is inferior to $1,5 \times 10^6$ UFC/ml, which is the value stipulated by the Ecuadorian Technical Norm NTE INEN 9:2012 Fifth Revision for Raw Milk. The sampling process was carried out twice in 41 delivery trucks during different dates, which gave a total of 82 samples. The study determined the pH and temperature average, the variety of microbial load according to the area of collection, and through the K-means method we were able to establish the correlation between the independent and dependent variables. The data and the results are reported in this study.

Key words: mesophilic aerobic micro-organisms, pH, temperature, UFC, metabolism.




Translated by,
Diana Lee Rodas

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PAGINA
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN Y PALABRAS CLAVES	IV
ABSTRACT	V
INDICE DE CONTENIDOS	VI
INDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE TABLAS	X
INTRODUCCION	1
COMPOSICION DE LA LECHE.....	1
COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE	2
MICROBIOLOGIA DE LA LECHE	4
METABOLISMO AEROBIO DE BACTERIAS.....	7
CAMBIOS EN LA LECHE ORIGINADOS POR CRECIMIENTO BACTERIANO	11
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	12
CAPITULO I	13
MATERIALES Y METODOS.....	13
1. MATERIALES	13
1.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS	13
1.2 DETERMINACION DEL NUMERO DE MUESTRAS.....	13
1.3 MUESTREO	14
1.4 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE AEROBIOS MESÓFILOS	14

1.4.1. MATERIALES USADOS.....	14
1.4.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	15
1.4.2.1 PREPARACIÓN AGAR PCA (PLATE COUNT AGAR)	15
1.4.2.2 PREPARACIÓN DE AGUA DE PEPTONA AL 0,1%....	15
1.4.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	15
1.4.4 CULTIVO DE LAS MUESTRAS	16
1.5 CÁLCULO DEL NÚMERO DE COLONIAS	16
2. METODOS	16
2.1 MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL	16
2.1.1. POBLACIÓN.....	16
2.1.2. MUESTRA.....	16
2.2. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS	17
2.3.HISTOGRAMA	17
2.4. MEDIA ARITMÉTICA DE UNA POBLACIÓN (μ)	17
2.4.1. MEDIA ARITMÉTICA DE UNA MUESTRA ($\bar{X}$).....	17
2.5. MODA	17
2.6. DISPERSIÓN	17
2.7. VARIANZA DE POBLACIÓN	17
2.8. DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA POBLACIÓN.....	17
2.9. VARIANZA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE UNA MUESTRA	18
2.10. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR (ANOVA)	18
2.10.1. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS	18
2.10.2 HIPÓTESIS NULA	18
2.10.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA	18
2.10.4.PASOS DEL ANÁLISIS DE LA VARIANZA PARA TAMAÑOS MUESTREALES DESIGUALES	18

2.11. NIVEL DE SIGNIFICANCIA	19
2.12 .ERROR TIPO I	20
2.13. ERROR TIPO II	20
2.14. VALOR P	20
2.15. GRADOS DE LIBERTAD	20
2.15.1 GRADOS LIBERTAD (GL) DEL NUMERADOR DEL ESTADÍSTICO F	20
2.15.2. GRADOS DE LIBERTAD (GL) EN EL DENOMINADOR DEL ESTADÍSTICO F	20
2.16. VALOR CRÍTICO PARA F	20
2.17. ANÁLISIS MULTIVARIANTE	20
2.18. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS (CLUSTERING)	21
2.18.1. CLUSTER JERARQUICOS AGLOMERATIVOS	21
2.18.2 CLUSTER NO JERÁQUICOS	21
2.18.2.1. K-MEANS	22
CAPITULO II	23
RESULTADOS	23
CAPÍTULO III	34
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	41
ANEXOS	42

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE	3
FIGURA 2. METABOLISMO AEROBIO DE BACTERIAS	10
FIGURA 3. HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	26
FIGURA 4. HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DEL PH.....	27
FIGURA 5. K-MEANS CLUSTERING (OBJECT - CLUSTER DISTANCES) DE LAS UFC/ML DE LAS MUESTRAS DE LECHE.....	30
FIGURA 6. K-MEANS CLUSTERING CENTROID PROFILES DE UFC/ML DE LAS MUESTRAS DE LECHE	30
FIGURA 7. PORCENTAJE DE MUESTRAS EN EL CLUSTER 1.....	32
FIGURA 8. PORCENTAJE DE MUESTRAS EN EL CLUSTER 2.....	32
FIGURA 9. PORCENTAJE DE MUESTRAS EN EL CLUSTER 3.....	33

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. COMPOSICIÓN DE LA LECHE	2
TABLA 2. AGENTES MICROBIANOS PATÓGENOS PRESENTES EN LA LECHE	6
TABLA 3. ATP FORMADOS EN EL METABOLISMO AEROBIO	9
TABLA 4. INFORMACIÓN RECOPIADA DE LOS CARROS COMERCIALIZADORES DE LECHE DURANTE EL MUESTREO	23
TABLA 5. VARIABLES USADAS EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
TABLA 6. ESTADÍSTICOS DE LA TEMPERATURA	26
TABLA 7. FRECUENCIAS DE LA TEMPERATURA	26
TABLA 8. ESTADÍSTICOS DEL PH	27
TABLA 9. FRECUENCIAS DEL PH	27
TABLA 10. RESULTADOS OBTENIDOS DEL CULTIVO EN UFC/ML CLASIFICADOS DE ACUERDO A LA ZONA DE DONDE SE RECOLECTA LA LECHE	28
TABLA 11: VARIANZA DE LAS UFC/ML EN LAS ZONAS DE RECOLECCIÓN DE LA LECHE	29
TABLA 12. ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UN FACTOR DE LAS UFC/ML EN LAS ZONAS DE RECOLECCIÓN DE LA LECHE	29
TABLA 13. CLASIFICACIÓN DE LAS ZONAS EN 3 CLUSTER DE ACUERDO A K-MEANS	30
TABLA 14. NÚMERO DE MUESTRAS EN EL CLUSTER 1	32
TABLA 15. NÚMERO DE MUESTRAS EN EL CLUSTER 2	32
TABLA 16. NÚMERO DE MUESTRAS EN EL CLUSTER3	33

Rojas Pesántez Jenny Marcela

Trabajo de Graduación

Sánchez Jauregui Claudio Esteban

Septiembre, 2013

“Estudio Preliminar de Aerobios Mesófilos en la leche cruda que se expende en carros repartidores en la ciudad de Cuenca”

INTRODUCCIÓN

La leche es “la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o cualquier otra especie, excluido el calostro” (Badui 2006).

Leche cruda “es la leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C)” (INEN 9:2012, Leche Cruda)

Al ser la leche un producto altamente perecedero y un vehículo de bacterias patógenas debe cumplir con estrictas normas de higiene desde su extracción para que llegue al consumidor con características de inocuidad, nutricionales y organolépticas que no atenten contra la salud de quien la consume; para ello es necesario por parte de quienes manipulan la leche poner en práctica buenas prácticas de ordeño con el fin de que la leche sea extraída con el menor número posible de microorganismos, evitar el uso de adulterantes como agua que puede ser una fuente de contaminación y mantener un almacenamiento durante el transporte y comercialización con temperaturas que no superen los 7°C para inhibir en parte el crecimiento de bacterias. Por lo expuesto anteriormente se plantea como objetivo el estudio de aerobios mesófilos en la leche cruda que ingresa a la ciudad de Cuenca para ser comercializada en carros que no manejan una cadena de frío y no están sujetos a ninguna norma nacional específica con el fin de determinar si ésta leche es apta para el consumo humano en cuanto al parámetro microbiológico estipulado por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9: 2012 Quinta Revisión para Leche Cruda.

Composición de la leche

A nivel físico es blanca y opaca con tonalidades amarillentas por la presencia de grasa y carotenos, olor característico, pH de 6.6, con un sabor ligeramente dulce, es uno de los alimentos más complejos y completos ya que está formada por agua, grasas, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales, además de otras sustancias presentes en menor concentración y que en conjunto forman un sistema fisicoquímico de más de 450 compuestos.

COMPOSICION DE LA LECHE					
	1	2	3	4	5
Materia grasa	3,76	3,53	3,80	3,6 - 5.1	3.9
Proteína bruta	3,25	3,51	3,50	3.5 - 4.9	3.5
Caseína	2,78	2,82			
Proteína del suero	0.47	0,68			
Lactosa	4,70	4,91	4,90	4.8 - 5	4.9
Sólidos totales	12,65	11,94	13	12.6 – 14.5	12.5 – 14.5
Sólidos no grasos	-	8,42	9,20		9
Cenizas			0,80		0.7

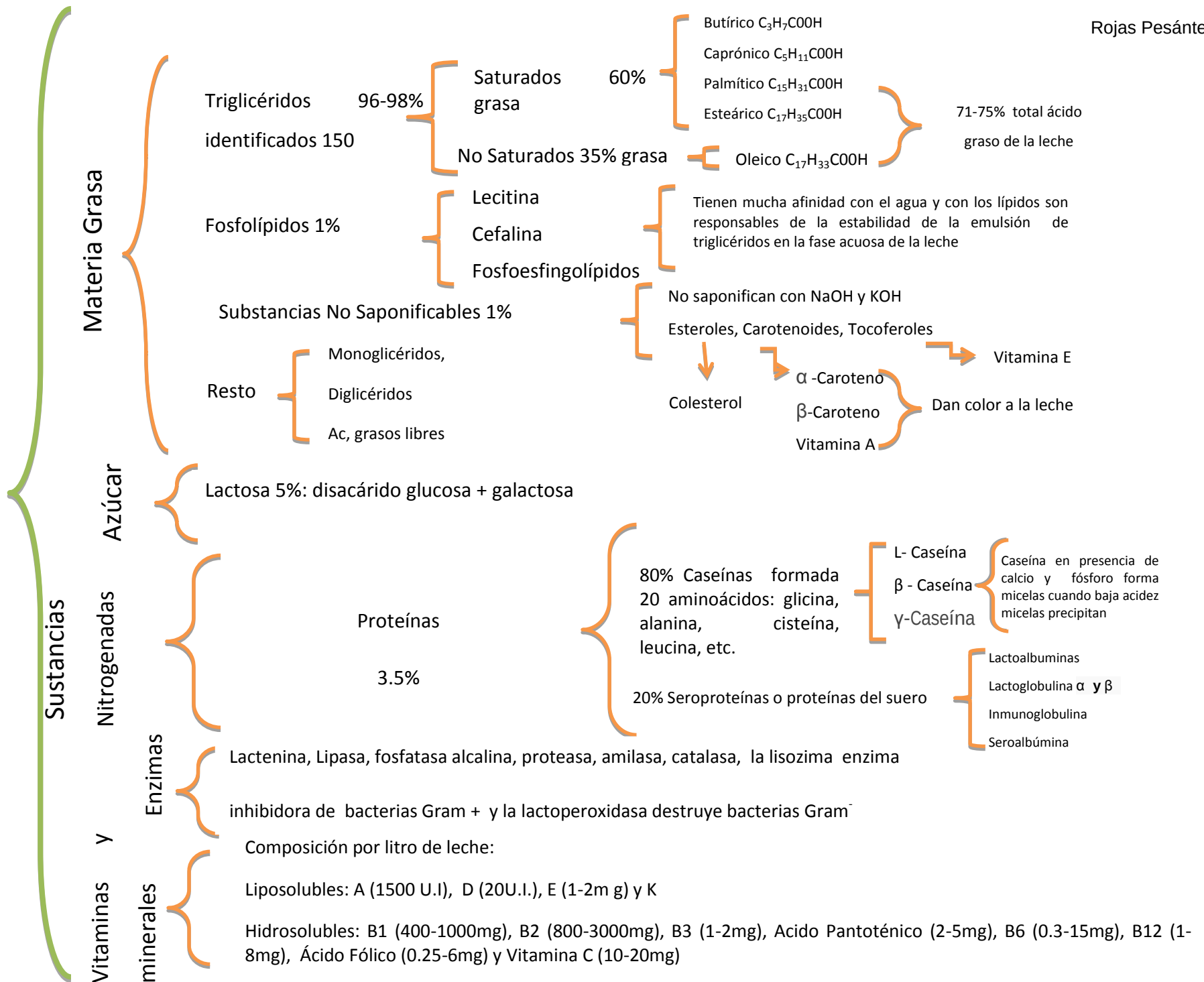
TABLA 1: Composición de la leche tomada de diversos autores: Badui A. (607), Pinto M., Carrasco E., Fraser L., Bernardo et al (97), Hernández A. (65), M. R. Adams y M.O. Moss (131), Loessner J, Golden D (156)

Composición Química de la leche.

Presenta un alto contenido de agua alrededor del 87%, grasa con un contenido mínimo de 3.25% y en ciertas razas puede llegar hasta 5%, los ácidos grasos se presentan en forma de glóbulos de grasa (10^{12} /litro) rodeados por una capa de fosfolípidos, el color de la grasa depende de los carotenoides del forraje; es una fuente de proteína de alta calidad formada de 5 clases de caseínas siendo la k- caseína la que mantiene la estabilidad de las micelas y las proteínas del suero que mantiene el equilibrio de la proteína de la leche formando una suspensión coloidal, otro componente de la leche son enzimas, vitaminas y minerales con un 0.7% (P, Ca, Mg, Na y K); ácidos orgánicos (cítrico, láctico, fórmico y acético).

FIGURA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE

COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE



Microbiología de la leche

El oxígeno constituye el 21% de la atmósfera terrestre y, en condiciones normales es el gas más importante que está en contacto con los alimentos ya que participa en su alteración facilitando el crecimiento de microorganismos aerobios. A diferencia de otros alimentos en la leche por sus propiedades físicas y químicas las bacterias se multiplican muy rápidamente siendo un factor importante el grado de contaminación inicial y la temperatura a la que se mantiene. El número de éste tipo de bacterias en la leche refleja las condiciones de higiene con que fue manipulada, se considera un producto higiénico cuando su conteo es menor o igual a 1×10^6 UFC/ml, si el valor es superior no se considera apta para el procesamiento ni consumo humano.

Los microorganismos pueden invadir la ubre a través de los conductos lácteos de las tetillas es por esto que la primera leche que sale tiene más bacterias que la última. Las bacterias de la leche pueden venir de dos fuentes: la que se encuentra en los tejidos de una vaca infectada y segundo las que llegan a la leche después de extraerla, es decir fuentes ajenas al animal.

Bacterias de ganado infectado: El *Bacilo tuberculoso* que llega a la leche por tuberculosis de la ubre o indirectamente por estiércol de la vaca o personas infectadas, otra bacteria que puede encontrarse es la *Brucella* la cual se excreta en la leche al igual que el virus de la fiebre aftosa. Si el animal se encuentra con una enfermedad inflamatoria del tejido mamario (mastitis) los microorganismos que usualmente producen dicha enfermedad son *Corinebacterium pyogenes*, *Pseudomona*, *Escherichia coli*, *Streptococos pyogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Bacterias de fuentes externas: Pueden ser no patógenas y patógenas.

Las Bacterias no patógenas de acuerdo a su fisiología se diferencian en acidificantes, alcalinizantes, proteolíticas e inertes.

- **Bacterias acidificantes:** Como *Staphylococcus aureus*, *Streptococos pyogenes* y *Escherichia coli* producen fermentación de la leche con formación de ácido láctico y en ocasiones ácido butírico. Responsables del agriado natural en la leche
- **Bacterias alcalinizantes:** Actúan sobre las proteínas de la leche liberando amoníaco o algunas bacterias aerobias producen lipasa descomponiendo la grasa y convirtiendo la leche en un líquido amarillo transparente.
- **Las bacteria proteolíticas:** A través de dos enzimas producen hidrólisis de las proteínas lácteas, la primera la enzima renina precipita las proteína formando un coagulo blanco y la segunda la caseasa efectúa la hidrólisis convirtiendo a la leche en un líquido claro, bacterias aerobias formadoras de esporas son las responsables.

- **Bacterias inertes:** Proviene del agua u otras fuentes no producen cambios visibles en la leche y constituyen la mayor parte de bacterias patógenas.

Bacterias patógenas: Provenientes de fuentes externas como:

1. **Animal:** escamas de la piel, pelos, suciedad, rabo
2. **Ambiente:** Contaminación aire, polvo, suelo
3. **El hombre:** manos, portador enfermedades
4. **Material ordeño:** Pezoneras, tuberías de conducción.
5. **Recipientes:** material sucio o mal lavado.
6. **Vectores:** Insectos, roedores

La capacidad de que un microorganismo patógeno pueda ocasionar enfermedad depende de ciertos factores como su virulencia, el número de células necesarias para producir daño, las condiciones a las que a estado expuesto el microorganismo inmediatamente antes de ser ingerido, así como la resistencia del hospedador (Grupos de alto riesgo YOPIs) . A continuación se resume en la tabla 2 enfermedades causadas por microorganismos aerobios mesófilos patógenos que pueden encontrarse en la leche.

TABLA 2. AGENTES MICROBIANOS PATÓGENOS PRESENTES EN LA LECHE

AGENTES MICROBIANOS PATOGENOS PRESENTES EN LA LECHE

Microorganismo	Dosis infectante células/gramo	Termo resistencia	Enfermedad	Formas contaminación en la leche
<i>Bacillus cereus</i> (toxina emética)	10^5 a 10^8	Esporas 1 minuto a 95°C	Síndrome diarreico: dolor abdominal, contracciones peristálticas, menos frecuente náusea y vómito	Suelo, vegetación contaminada
<i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	Se estima < 500	0,1 - 0,2 minutos a 65,5°C	Brucelosis: Fiebre ondulante, sudoraciones nocturnas, astenia, infertilidad.	Vacas portadoras excretan en la leche
<i>Campylobacter jejuni</i>	menos 10000 células	0.1- 0,2 minutos x 60°C	Enteritis aguda: fiebre, Dolor Cabeza, Diarrea	Presente tracto intestinal vaca
<i>Corynebacterium bovis</i>		55-60°C	Difteria	Operarios de la leche portadores de la enfermedad
<i>Clostridium perfringens</i> (enterotoxina)	10^6 a 10^7		Gastroenteritis leve o necrotizante en casos	Contaminación cruzada con heces de animales o humanos
<i>E. coli</i> Enteropatógena (ETEC)	10^6 o más	68.3°C por 40 segundos	Diarrea del viajero Gastroenteritis infantiles	Durante ordeño manos contaminadas, falta limpieza del animal, utensilios, agua contaminada
<i>Listeria monocytogenes</i> (Anaerobio Facultativo)	1000 células en inmunodeprimidos	1-15 segundos a 72°C	Inmunodeprimidos: gastroenteritis febril aguda. Síntomas más graves como meningitis y meningo-encefalitis. Aborto en embarazadas, artromialgia.	Tubo digestivo vaca, piensos contaminados, suelo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	No determinado	60°C 30 minutos	Tuberculosis articular y ósea	Vacas portadoras, heces, Personas infectadas. Contaminación cruzada equipo de trabajo o agua
<i>Staphylococcus aureus</i> Aerobio facultativo (enterotoxina)	10^5 a 10^7	0,1-1 segundos a 72°C	Vómito, dolor cabeza, y estomacal fiebre	Glándulas mamarias infectadas, bacterias origen humano(manos ordeñador)
<i>Salmonella entérica typhi</i>	Menor 1000 células, infantes son más sensibles	0,3 – 12 segundos a 72°C	Tifoidea y paratifoidea Fiebre persistente, leucopenia, Gastroenteritis, dolor cabeza	Manos individuos infectados, Agua contaminada, Moscas, Utensilios infectados
<i>Shigella</i> (Enterotoxina)	10-200	Muy sensible a la temperatura	Disentería bacilar: diarrea, fiebre, calambres estomacales, cefaleas	Contaminación Fecal-oral
Virus	10-100 pv	85°C por 1 minuto	Hepatitis A: ictericia, náusea, dolor abdominal	Manos sucias personas infectadas. Agua contaminada

Fuente : Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, FDA , Microbiología de los alimentos disponible en <http://www.xuletas.es/ficha/microbiologia-de-los-alimentos>

Metabolismo Aerobio de bacterias

Las sustancias químicas que necesitan las bacterias para crecer y multiplicarse constituyen sus necesidades nutritivas para obtener:

1. Fuentes de energía
2. Piedras de construcción para la síntesis de nuevo material celular (C, N)
3. Crecimiento
4. Metabolismo

La composición de la leche posee los 4 macronutrientes requeridos por las bacterias como son Carbono, Hidrógeno, Oxígeno y Nitrógeno presentes en forma de Carbohidratos, Lípidos y Proteínas, además de poseer Vitaminas micronutriente esencial para su existencia y que las bacterias por sí mismas no pueden sintetizar. Si a los macronutrientes y micronutrientes que posee la leche contribuye su pH de 6.5 - 6.7 , actividad acuosa de 0.97 que favorece el crecimiento de bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras coadyuvado por la temperatura ambiente si la leche no permanece en refrigeración se vuelve un medio ideal para que bacterias quimiorganotróficas puedan desarrollarse y multiplicarse.

El metabolismo aerobio de las bacterias produce la oxidación de carbohidratos, proteínas o grasas generando ATP (Adenosin Trifosfato) un compuesto de alta energía usado en casi todos los acontecimientos fisiológicos. Los microorganismos aerobios ocasionan una serie de cambios químicos en la leche en donde los tres componentes más afectados son lactosa, proteínas y grasa.

Los carbohidratos es el primer nutriente que metabolizan los microorganismos para obtener su energía, seguido de proteínas y finalmente lípidos. Los carbohidratos se oxidan con el fin de proporcionar energía, la glucosa es el monosacárido más frecuente en la naturaleza como azúcar libre, para obtener glucosa en la leche el disacárido lactosa es hidrolizado en dos monosacáridos glucosa y galactosa en presencia de la enzima glucosa oxidasa que cataliza la reacción y rompe la lactosa en glucosa y galactosa.

Glucólisis: Una vez formado los monosacáridos tienen que convertirse en un intermedio de fosfato de azúcar es decir que la glucosa se convierta en ácido pirúvico, los pasos para éste proceso son los siguientes:

- 1) La glucosa es fosforilada por el ATP dando Glucosa- 6-Fosfato catalizada por la enzima Hexoquinasa.
- 2) Glucosa 6-Fosfato es convertida a un isómero Fructosa- 6 Fosfato catalizada por la enzima glucosa-6-fosfatisomerasa.

3) Se produce una segunda fosforilación en donde la Fructosa-6-fosfato recibe un Fósforo del ATP y se convierte en Fructosa 1,6- di fosfato. La reacción es catalizada por la enzima Fosfo-fructokinasa.

4) La enzima aldolasa rompe la fructosa 1,6 difosfato en 2 moléculas de 3 carbonos cada uno el gliceraldeido-3-fosfato.

5) En ésta etapa ocurre la primera reacción redox, el gliceraldeido-3-fosfato es deshidrogenado por la enzima gliceraldeido 3-fosfato deshidrogenasa y al mismo tiempo se fija una molécula de Fósforo inorgánico para formar el 1,3-difosfoglicerico. El Hidrógeno es usado para reducir la coenzima NAD que acepta 2 átomos de hidrógeno convirtiéndose $\text{NADH} + \text{H}^+$ durante la reacción. La reacción ocurre dos veces una por cada molécula de gliceraldeido-3-fosfato.

6) La enzima fosfoglicerato quinasa transfiere el grupo fosfato del ácido 1,3-disfosfoglicerico a una molécula de ADP, generando así la primera molécula de ATP de la vía. Como la glucosa se transformó en 2 moléculas de gliceraldeido, en total se recuperan 2 ATP en esta etapa.

7) La enzima fosfoglicerato mutasa cataliza la isomerización de 3- fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato cambiando únicamente la posición del fosfato del carbono 3 al carbono 2

8) La enzima enolasa cataliza la eliminación de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato convirtiéndose en Fosfoenolpiruvato.

9) Desfosforilación del Fosfoenolpiruvato en Piruvato y ATP catalizado por la enzima Piruvato Kinasa

10) Parte de Piruvato se convierte en ácido Láctico por acción de la enzima Lactato deshidrogenasa y otra parte ingresa a la Descarboxilación oxidativa, concluyendo la Glucólisis.

Descarboxilación Oxidativa: En esta etapa el piruvato sale del citoplasma e ingresa a la matriz de la mitocondria gracias a su alta permeabilidad, el ácido pirúvico que posee 3 átomos de Carbono sufre oxidación catalizada por la enzima piruvato deshidrogenasa aquí un grupo carboxilo es eliminado en forma de dióxido de carbono, quedando el grupo acetilo que a su vez es aceptado por uno de los co-factores (coenzima-A) de la enzima generando una molécula de acetilo acoplado a la Coenzima A (Acetil-CoA). El último aceptor de electrones de esta secuencia de reacciones es el NAD^+ , que se reduce generando NADH e H^+ . El acetil-CoA ingresa al ciclo de Krebs.

Ciclo de Krebs : Consiste es una serie de reacciones cíclicas para la oxidación completa del Acetil-CoA gracias a 8 enzimas que catalizan la reacción transformándole en CO_2 y H_2O . Por cada grupo acetilo oxidado se producen:

- 3 moléculas de NADH (di nucleótido de nicotinamina y adenina reducido) y 3 H^+ ,
- 1 de FADH₂
- 1 de ATP.

El NADH y FADH₂ ingresan a la cadena transportadora iniciando la fosforilación oxidativa.

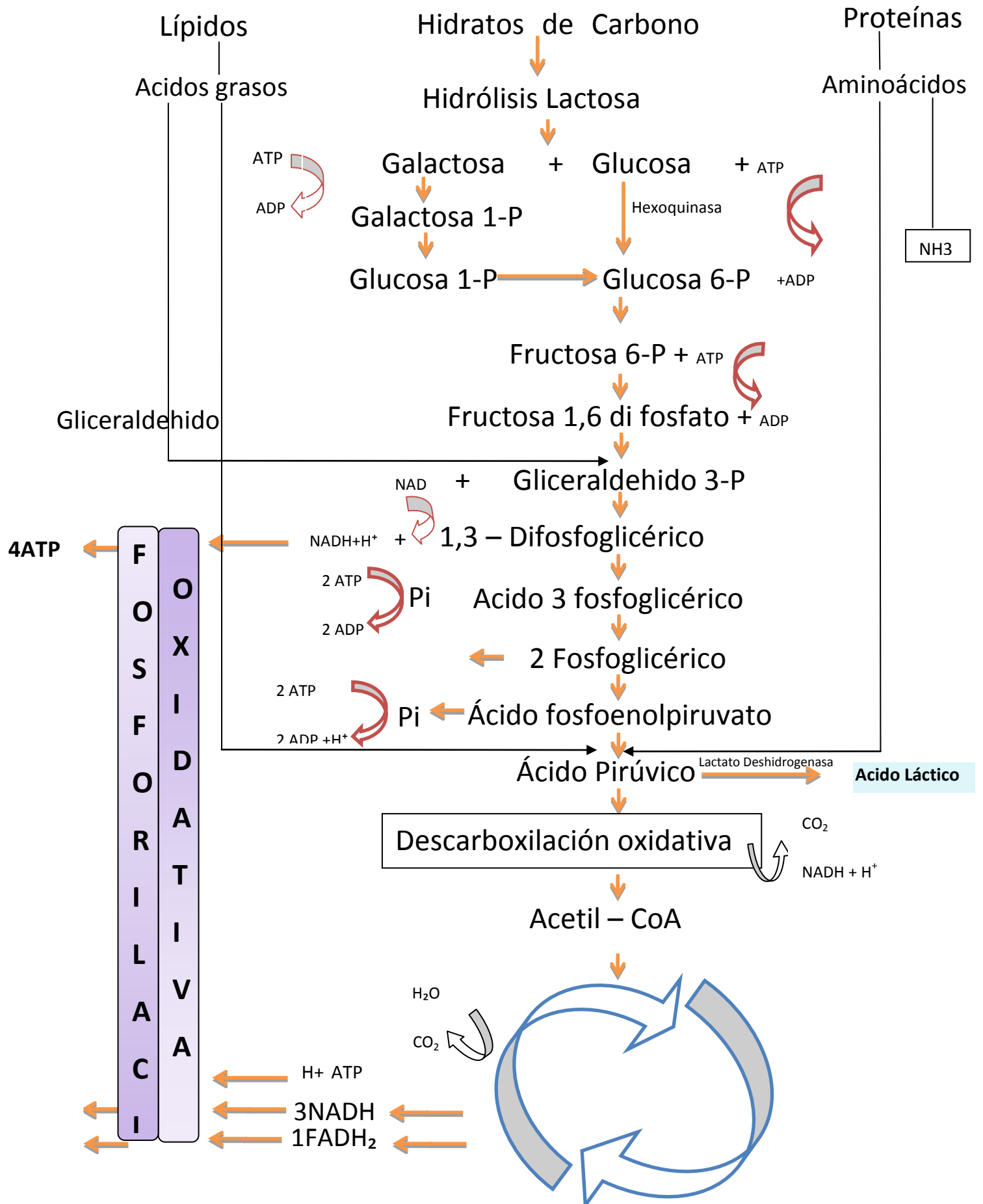
Transporte de electrones y fosforilación oxidativa: En aerobios mesófilos las coenzimas NADH y FADH₂ son muy escasos en la célula por lo que deben ser rápidamente oxidados para que puedan intervenir de nuevo en las reacciones anteriores, para lo cual deben ceder sus electrones siendo el aceptor final de estos el oxígeno pero el paso de estos desde las coenzimas al oxígeno no ocurre directamente, sino que lo hacen a través de una serie de reacciones de oxidación-reducción de un conjunto de enzimas unidas a coenzimas que reciben el nombre de cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria. Estas coenzimas se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias y constituyen tres complejos enzimáticos los cuales se encargan de transportar los electrones a lo largo de toda la cadena y llevar los protones (H^+) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana; al llegar al tercer complejo los dos electrones son entregados al oxígeno molecular que se reduce al ion O^{2-} que al unirse con 2 H^+ de la matriz forma una molécula de H_2O . Cada molécula de NADH libera 2 electrones y lleva 6 protones al espacio intermembrana, en cambio el FADH₂ transporta 2 electrones y lleva 4 protones al espacio intermembrana. Al ser mayor el número de protones en el espacio intermembrana que en la matriz se genera una diferencia de potencial que activa una enzima (ATP-sintetasa) que cataliza la reacción del ADP con un grupo fosfato para formar ATP.

Cada molécula de NAD sintetiza 3 moléculas de ATP y cada molécula de FADH₂ sintetiza 2 moléculas de ATP. La carga de energía proveniente de la glucólisis entra también en la cadena transportadora y por cada molécula de NADH sintetiza dos moléculas de ATP.

Coenzima	Origen donde sintetizan	Número de ATP
10 NADH	Glucólisis(2) Acetil - CoA y Ciclo Krebs	30
2FADH ₂	Ciclo Krebs	4
	Glucólisis y Ciclo Krebs	4
TOTAL		38

Tabla 3. ATP formados en el metabolismo aerobio

Fuente: Tratado de Microbiología Burrows W, 1984



Metabolismo de proteínas: Son hidrolizadas a sus correspondientes aminoácidos y tras la eliminación de los grupos amino sus cadenas carbonadas se transforman en ácido pirúvico o en algún intermediario del ciclo de Krebs.

Metabolismo de Lípidos: Son hidrolizados por acción de lipasas a ácidos grasos y glicerol. El glicerol se incorpora en la glucólisis mientras que los ácidos grasos son oxidados para dar Acetil-CoA que se incorpora en el ciclo de Krebs dando un total de 131 ATP.

Cambios en la leche originados por crecimiento bacteriano.

En la primera hora luego del ordeño por la acción de las enzimas inhibidoras de la leche (lactenina, lactoperoxidasa y lisozima) se produce una disminución de la flora. Si no se frena el crecimiento microbiano con la temperatura se producirá cambios fisicoquímicos como descenso en el pH de 4,5 - 4 por la formación de ácido láctico, la velocidad de acidificación depende de la temperatura y el microorganismo que la origina, el ácido láctico se combina con el calcio de la caseína y la leche coagula, gérmenes responsables pueden ser homo y heterolácticas como *coliformes*, *enterococos*, y *lactobacillus*.

La proteólisis de la leche producida por *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Clostridium* se manifiesta por un olor, y ligera alcalinización.

Los cambios en la coloración de la leche son producidos por *Pseudomonas*, *Serratia* o *Pseudomona spp*, *Chromobacterium violaceum*.

Olor a rancio producido por *Pseudomonas* y *Bacillus cereus*, olor a pescado debido a la formación de trimetilamina por *Pseudomonas*.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la carga de aerobios mesófilos en la leche cruda que ingresa a la ciudad de Cuenca en carros repartidores que recolectan la leche del sector Tutupali, Victoria del Portete y alrededores con el fin de establecer si cumple con el requisito microbiológico dado en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9 :2012 Quinta Revisión para Leche Cruda

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar análisis microbiológico de aerobios mesófilos en la leche que ingresa a la ciudad proveniente de Tutupali, Victoria del Portete y alrededores.
- Registrar la temperatura de la leche en los carros muestreados.
- Control al ingreso a la ciudad registrando hora, ruta y volumen de leche que transportan diariamente.
- Establecer el porcentaje de carros que cumplen con los requisitos microbiológicos establecidos por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2012 Quinta Revisión para Leche Cruda.
- Recomendar alternativa para detener el crecimiento microbiano durante la distribución de la leche.
- Dar a conocer los resultados, conclusiones y recomendaciones a entidad gubernamental Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro: Agrocalidad.

CAPITULO I

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

El análisis de aerobios mesófilos de las muestras de leche cruda se realizó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay en la ciudad de Cuenca.

1.1 Origen de las Muestras:

Las muestras fueron tomadas de los carros que ingresan con leche cruda recolectada de la zona Sur de la ciudad específicamente de los sectores de:

- Tarqui
- Irquis
- Victoria del Portete
- Cumbe
- Tutupali Chico y Grande
- Zhucay

1.2 Determinación del número de muestras

De los lugares mencionados existe un universo de 46 carros registrados en Agrocalidad que cuentan con el permiso para recolectar la leche y luego comercializarla cruda en la ciudad de Cuenca, para determinar el número de carros a muestrear se utilizó la fórmula del método aleatorio simple sin reposición para una población finita en la cual es conocido el tamaño de la población.

El tamaño de la muestra se determinó con las fórmulas:

$$n_o = \frac{Z^2 S^2}{d^2} \qquad n = \frac{n_o}{1 + (n_o / N)} \qquad (\text{Ciro Martínez, 1984})$$

En donde:

N= Tamaño poblacional

n= Tamaño muestral

n_o = primera aproximación para poblaciones finitas

S^2 = varianza poblacional que para el estudio se considera 0.5 porque existe un 50% de probabilidad de que el carro cumpla con la norma y el 50% de que no cumpla.

d = error de muestreo se considera 5% para el estudio.

Z = nivel de confianza obtenido de tablas (Ciro Martínez, 1984)

Cuando el nivel de confianza es 95% el valor de $z = 1,96$

Sustituyendo valores en las fórmulas tenemos que $n_0 = 384,16$, si el tamaño de la población es 46 carros el tamaño muestral n es **41** carros.

1.3 Muestreo

Los carros fueron elegidos al azar de cada carro se recolectó dos muestras en fechas distintas. Se procedió a tomar de cada una de las cantarillas una cantidad de 250cm^3 de leche aproximadamente las mismas que eran colocaban en un recipiente recolectándose de 1 a 2 litros dependiendo del número de cantarillas que transportaba el carro, la leche se homogenizada y con un termómetro de alcohol se tomaba la temperatura, previo a la medición se colocaba una cantidad de 200cm^3 de la leche en frascos estériles e identificados con un número, las muestras se almacenaba en un cooler provisto de ice packs para mantener frías las muestras hasta el momento de realizar el análisis microbiológico.

Cada carro era codificado con un número para poder identificarlos en un registro con la siguiente información:

- Número de muestra
- Hora de recolección muestra
- Nombre de la persona que comercializa la leche
- Placa del vehículo
- Temperatura de la leche
- Zona de donde recolectaba la leche
- Zona en donde comercializaba la leche
- Litros que transportaba
- Número de proveedores

Los materiales usados durante el muestreo fueron:

- Agitador de disco pequeño
- Cucharón
- Termómetro
- Jarra
- Cooler
- Ice Pack Rainbow
- Frascos estériles
- Cofia, mascarilla y mandil
- Alcohol potable 70% para limpieza de utensilios.

1.4 Determinación de la cantidad de aerobios mesófilos.

1.4.1. Materiales usados:

- Micropipetas 10 – 1000 μl y 5000 μl
- Puntas universales para micropipetas limpias y estériles.

- Cajas petri de 15 x 90mm
- Frascos de boca ancha con tapa rosca de 500cm³ y 1000cm³
- Tubos de ensayo
- Balanza
- Baño María de 45+ 1°C
- Incubadora regulable
- Autoclave
- Potenciómetro
- Probetas 10 , 100 y 1000cm³
- Vasos precipitación 200cm³ y 500cm³
- Espátula
- Refrigeradora
- Gradillas

1.4.2 Medios de cultivo

- Agar P.C.A Merck (caseína-glucosa-extracto de levadura)
- Agua de peptona al 0.1% (Difco peptone wáter)

1.4.2.1 Preparación Agar PCA (Plate Count Agar) Para cumplir con el requerimiento del pH exigido por la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-1:99 Control microbiológico de los Alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos se sigue las instrucciones de Merck el fabricante del AGAR en donde es necesario disolver por cada litro de agua destilada 22.5g de Agar PCA, reposar por 15 minutos y colocar en la autoclave durante 15 minutos a 121°C. El pH que se obtiene es 7 ± 0.2 a 25°C.

1.4.2.2 Preparación de Agua de peptona al 0,1%

De acuerdo a indicaciones de DIFCO fabricante de la peptona se disolvió 15g de peptona por cada 1000cm³ de agua destilada para obtener una solución con un pH 7 ± 0.2 .

Con una micropipeta se mide 9 ml de la solución del agua de peptona y se coloca en tubos de ensayo con sus respectivas tapas y se los lleva a la autoclave durante 15 minutos a 121°C.

1.4.3 Preparación de la muestra:

- La mesa de trabajo en el laboratorio antes de cada cultivo fue limpiada con agua y detergente y secada con papel toalla para luego desinfectarla con alcohol potable al 70%v/v, y un mechero encendido en el área de cultivo.
- El frasco que contiene la muestra se lo agitaba 25 veces para que la leche se homogenice
- Con una micropipeta se tomó 1cm³ de leche y se colocó en el tubo que contiene 9cm³ de agua de peptona se homogeniza cuidadosamente constituyendo dicho tubo una dilución igual a 10^{-1} . De este tubo se tomó 1cm³ y se colocó en un segundo

tubo el cual constituye una dilución de 10^{-2} ; se repite hasta obtener una dilución de 10^{-7} . Para preparar cada dilución se usó puntas diferentes y estériles.

1.4.4 Cultivo de las muestras:

- En diferentes cajas petri estériles e identificadas se colocó 1cm^3 de las diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} .
- En cada una de las placas inoculadas se adicionó de 15 - 20 cm^3 del Agar - PCA fundido y templado a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ aproximadamente. La adición del medio no debió pasar más de 45 minutos a partir de la primera dilución.
- Se mezcló el inóculo sembrado con el agar impartiendo en la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en sentido contrario, teniendo cuidado de no mojar la tapa y evitar salpicaduras.
- Se dejaba reposar las placas tapadas hasta que se solidifique el Agar.
- Las cajas petri se colocaban invertidas y separadas de las paredes y techo de la estufa.
- Hasta 6 placas se colocaba una sobre otra en la incubadora a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas.
- Junto con las pruebas en la estufa se colocaba Agar en una caja petri sin inóculo para comprobar que no exista contaminación del medio de cultivo o del ambiente.
- Se retiraba las placas petri de la estufa aproximadamente a las 48 horas y se procedía al conteo (Norma Técnica Ecuatoriana INEN: 1529-5:2006. Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos).

1.5 Cálculo del número de colonias:

El número total de colonias contadas, multiplicadas por el factor de dilución de la placa elegida, da como resultado el recuento total de gérmenes por gramo o mililitro de la muestra analizada (Pascual M., Calderón V., 2000)

El número de colonias de aerobios mesófilos por cm^3 de leche se calculó con la fórmula:

$$c = n \cdot f$$

c= número de bacterias aerobias mesófilos por ml de muestra

n= número de colonias

f = inverso del valor de la dilución de la muestra. (Norma Técnica Ecuatoriana INEN Leche y Productos Lácteos. Determinación de bacterias aerobias. NTE. INEN 734:1984.)

2. METODOS

2.1 Medidas de tendencia central:

2.1.1. Población: Es un conjunto de todos los elementos que están en estudio.

2.1.2. Muestra: Consiste en n observaciones de una población. Es decir una parte de la población.

2.2. Distribución de frecuencias: Es una tabla en donde se organizan los datos en clases, es decir en grupos de valores que describen una característica de los datos.

2.3. Histograma: Es una representación gráfica de una variable en forma de barras, cuyo ancho es proporcional al rango de los valores que se encuentran dentro de una clase, y la altura es proporcional al número de elementos que se encuentran dentro de la clase.

2.4. Media aritmética de una población (μ): Medida de tendencia central que representa el promedio de todos los elementos del grupo. El número de elementos de la población se denota con "N"

$$\mu = \frac{\sum X}{N} \quad (\text{Levin R., Rubin D., 2004})$$

2.4.1. Media aritmética de una muestra ($\bar{X}$): Es el promedio de una muestra de la población. El número de elementos de la muestra se denota con "n".

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} \quad (\text{Levin R., Rubin D., 2004})$$

En donde $\sum x$ es la suma de los valores de todas las observaciones

2.5. Moda: Es el valor que más se repite en el conjunto de datos.

2.6. Dispersión: Es la separación o variabilidad de un conjunto de datos. Existen dos medidas de desviación promedio: la varianza y la desviación estándar.

2.7. Varianza de población (σ^2): Medida del cuadrado de la distancia promedio entre la media y cada observación de la población.

La fórmula para calcular varianza es:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x - \mu)^2}{N} \quad (\text{Levin R., Rubin D., 2004})$$

2.8. Desviación Estándar de la población (σ): Describe cuanto se apartan las observaciones individuales de una distribución de la media. Es igual a la raíz cuadrada positiva de la varianza.

La fórmula para calcular la desviación estándar es:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \mu)^2}{N}} \quad (\text{Levin R., Rubin D., 2004})$$

2.9. Varianza y desviación estándar de una muestra: Se utiliza las fórmulas:

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n-1} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Levin R., Rubin D., 2004})$$

Varianza de una muestra

Desviación estándar de una muestra

2.10. Análisis de Varianza de un factor (ANOVA): Técnica estadística utilizada para probar la igualdad entre tres o más medias muestrales y hacer inferencias sobre si las muestras provienen de poblaciones que tienen la misma media. (Levin R., Rubin D., 2004).

El modelo ANOVA mide la significación estadística de las diferencias entre las medias de los grupos determinados en la variable dependiente por los valores de las variables independientes. El modelo unifactorial se presenta cuando tenemos un solo factor estudiado en sus distintos niveles, que influyen sobre una variable respuesta que mide el resultado del experimento, y el resto de los factores miden el error experimental influyendo sobre la variable respuesta de forma no controlable. (Pérez, 2009)

2.10.1. Planteamiento de la hipótesis: Permite determinar si las medias muestrales pudieron haberse tomado de poblaciones con la misma media μ .

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots \dots \text{ (Hipótesis nula)}$$

$$H_1: \mu_1, \mu_2, \mu_3 \dots \text{ no son todas iguales (hipótesis alternativa)}$$

2.10.2 Hipótesis nula: Suposición respecto a un parámetro de población que deseamos probar.

2.10.3. Hipótesis alternativa: Conclusión que se acepta cuando los resultados no respaldan la hipótesis nula

El análisis de varianza está basado en la comparación de dos estimaciones diferentes de la varianza σ^2 de una población total. Cuando la hipótesis nula es verdadera las dos estimaciones deben tener un valor aproximadamente igual. Si las dos estimaciones difieren de manera considerable la hipótesis nula no es verdadera (Levin R., Rubin D., 2004)

2.10.4. Pasos del análisis de la varianza para tamaños muestrales desiguales:

1. Determinar una estimación de la varianza de la población a partir de la varianza entre las medias de las muestras. También se conoce como varianza entre columnas.

$$\hat{\sigma}_b^2 = \frac{\sum n_j (\bar{x}_j - \bar{\bar{x}})^2}{k - 1}$$

Donde:

- $\hat{\sigma}_b^2$ = Varianza entre columnas
- n_j = tamaño de la j -ésima muestra
- $\bar{x}_j$ = media muestral de la j -ésima muestra

- $\bar{\bar{x}}$ = gran media o valor de todos los valores muestrales combinados
 - k = número de muestras
2. Determinar una segunda estimación de la varianza de la población a partir de la varianza dentro de las muestras, Se le conoce también como varianza dentro de columnas.

$$\hat{\sigma}_w^2 = \sum \left(\frac{n_j - 1}{n_T - k} \right) s_j^2$$

Donde:

- $\hat{\sigma}_w^2$ = varianza dentro de las columnas
 - s_j^2 = varianza muestral dentro de j -ésima muestra
 - $n_T = \sum n_j$ = tamaño de la muestra total
3. Comparar estas dos estimaciones. Si su valor es aproximadamente igual, aceptar la hipótesis nula.

$$F = \frac{\text{Varianza entre columnas o grupos}}{\text{Varianza dentro de las columnas o grupos}}$$

El estadístico F cuando su valor es pequeño (cercano a 1) quiere decir que no hay diferencia significativa entre las medias muestrales, la inclinación es a aceptar la hipótesis nula; de lo contrario conforme F crece se rechaza la aseveración de medias iguales y la tendencia es a rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa. Es decir cuando la varianza entre columnas es mayor que la varianza dentro de columnas el valor F tiene a ser grande lo que conduce a aceptar la hipótesis alternativa.

2.11. Nivel de significancia: Es el valor que indica el porcentaje de valores de la muestra que están fuera de ciertos límites; es decir la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es cierta. Se representa con la letra α (alfa)

2.12 .Error tipo I: Es rechazar una hipótesis nula cuando es cierta, se simboliza con la letra griega α (alfa). A mayor nivel de significancia mayor es la posibilidad de rechazar la hipótesis nula.

2.13. Error tipo II: Es aceptar una hipótesis nula cuando es falsa, se simboliza con la letra griega β (beta)

2.14. Valor P: Es la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido suponiendo que la hipótesis nula es cierta. Es otra manera de analizar la hipótesis nula, por tanto el valor P es el nivel máximo de significancia para el cual aceptamos la hipótesis nula. Si el valor P es igual o menor que α se rechaza la hipótesis nula.

2.15. Grados de libertad: Número de valores de una muestra que podemos especificar libremente. Cuando la hipótesis nula es verdadera los grados de libertad vienen dados por las fórmulas usadas en el cálculo del Estadístico F.

2.15.1 Grados libertad (GL) del numerador en el estadístico F: Siempre es una unidad menor que el número de muestras y se calcula por la fórmula:

$$GL = k - 1 \text{ (Levin R., Rubin D., 2004)}$$

2.15.2. Grados de libertad (GL) en el denominador del cociente F:

$$GL = \sum (n_j - 1) = n_T - 1 \text{ (Levin R., Rubin D., 2004)}$$

2.16. Valor Crítico para F: Con el valor de los grados de libertad obtenidos tanto para el numerador como el denominador podemos obtener en tablas (ver anexo) el valor **crítico de F**, dicho valor nos indica la región en donde se encuentra el valor F de la muestra para un nivel de significancia establecido.

- Si $F < F$ crítico se acepta la hipótesis nula
- Si $F > F$ crítico se desecha la hipótesis nula

2.17. Análisis multivariante: Es el conjunto de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente conjuntos de datos multivariantes en el sentido de que hay varias variables medidas para cada individuo u objeto estudiado.

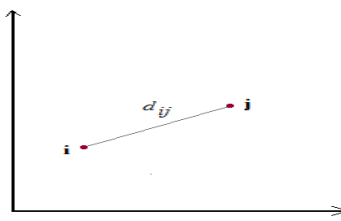
Las técnicas multivariantes se clasifican en tres grupos:

1. **Métodos de dependencia:** Consiste en determinar si las variables independientes inciden de alguna forma sobre las dependientes y de qué forma
2. **Métodos de interdependencia:** Analiza que variables están relacionadas, cómo lo están y porque sin distinguir entre variables dependientes e independientes. Ejemplo: Análisis clúster.
3. **Métodos estructurales:** Las variables están divididas en dependientes e independientes, analiza como las variables independientes afectan a las dependientes y como están relacionados los dos grupos entre sí.

2.18. Análisis de Agrupamientos (Clustering)

Clúster: Es un método estadístico multivariante de clasificación automática que a partir de una tabla de datos (casos-variables), trata de situarlos en grupos homogéneos, conglomerados o clúster, no conocidos de antemano, de manera que los individuos que puedan ser considerados similares sean asignados a un mismo clúster, mientras que individuos diferentes (disimilares) se localicen en clúster distintos. Los miembros de un conglomerado gozarán de características comunes que los diferencian de los miembros de otros conglomerados. Estas características deberán ser genéricas y es claro que difícilmente una única característica podrá definir un conglomerado. (Pérez, 2009)

Las métricas de similitud se basan en la distancia entre los objetos, la más utilizada es la distancia euclidiana cuya fórmula viene dado por:

$$d_{i,j} = \left[\sum_{k=1}^p (x_{i,k} - x_{j,k})^2 \right]^{1/2}$$


Existen dos métodos de clasificación en los clúster:

2.18.1. Clúster Jerárquicos aglomerativos: La clasificación resultante tiene un número creciente de clases anidadas (dendograma)

Dendograma: Es una representación gráfica en forma de árbol que resume el proceso de agrupación de un análisis de clúster. Los objetos similares se conectan mediante enlaces cuya posición en el diagrama está determinada por el nivel de similitud/disimilitud entre los objetos. (Villardón JLV)

2.18.2 Clúster no jerárquicos: No presenta clases anidadas, es un método que permite procesar un número ilimitado de casos, tiene por objetivo realizar una sola partición de los individuos en K-grupos lo que implica que el investigador establezca a priori los grupos que deben ser formados siendo la principal diferencia de los métodos jerárquicos y no requiere su conversión en una matriz de proximidades se trabaja con la matriz de datos originales.

Uno de los métodos no jerárquicos es el de *reasignación* y permiten que un individuo asignado a un grupo en un determinado paso del proceso sea reasignado a otro grupo en un paso posterior si esto optimiza el criterio de selección. El proceso termina cuando no quedan individuos cuya reasignación permita optimizar el resultado que se ha conseguido. El algoritmo más conocido dentro de éste método es el de K-means o K-medias (McQueen 1967) el cual se agrupa bajo el nombre de métodos centroides. (Pérez, 2009)

2.18.2.1. K-means: Parte de medias arbitrarias y, mediante pruebas sucesivas, contrasta el efecto que sobre la varianza residual tiene la asignación de cada uno de los casos a cada

uno de los grupos. El valor mínimo de varianza determina una configuración de nuevos grupos con sus respectivas medias. Se asignan otra vez todos los casos a estos nuevos centroides en un proceso que se repite hasta que ninguna transferencia puede ya disminuir la varianza residual; o se alcance otro criterio de parada: un número limitado de pasos de iteración o, simplemente, que la diferencia obtenida entre los centroides de dos pasos consecutivos sea menor que un valor prefijado. El algoritmo es el siguiente:

1. Dispone de una partición (aleatorio) de los objetos en K clúster
2. Determinará el centroide de cada clúster
3. Calcula la distancia entre cada objeto y cada centroide
4. Asigna cada objeto al clúster más cercano
5. Si al menos un objeto es desplazado en otro clúster, se retorna al paso 2.
6. Termina (Todeschini, 1995)

K-means proporciona una solución final única para el número de clúster elegido, a la que se llegará con menor número de iteraciones cuanto más cerca estén las 'medias' de arranque de las que van a ser finalmente obtenidas. (Perez,2009)

Todos los análisis de los resultados obtenidos en el muestreo se realizaron en programas de computadora para evitar lo demorado que implica calcular manualmente cada una de las técnicas mencionadas en éste capítulo.

CAPITULO II

RESULTADOS

Tabla 4. Información recopilada de los carros comercializadores de leche durante el muestreo.

Zona	# muestra	Temperatura Muestra	# colonias	pH	# proveedores	Litros transportados diariamente
A	2	22	1200000	6,69	6	171
A	3	23	88000000	6,85	5	150
A	4	24	8000000	6,71	17	400
A	13	27,5	820000	6,79	23	350
A	15	25	2700000	6,72	12	240
A	35	23	320000	6,69	3	220
A	23	22	900000	6,85	3	200
A	26	25	300000	6,77	13	500
A	27	28	400000	6,55	24	300
A	30	26	3200000	6,65	14	230
A	32	27	1000000	6,7	4	116
A	90	26	370000	6,64	6	180
A	50	28	2000000	6,65		380
A	89	24	2000000	6,62	3	160
A	106	23.5	34000000	6,76	19	320
A	71	23	560000	6,55	6	171
A	46	25	1500000	6,67	5	150
A	36	26	400000	6,57	17	400
A	65	26	1600000	6,55	23	350
A	63	26	1010000	6,57	12	240
A	73	19	300000	6,51	3	220
A	91	22	600000	6,62	3	200
A	42	23.5	1600000	6,65	13	500
A	49	27,5	6000000	6,64	24	300
A	45	23	6000000	6,63	14	230
A	41	27	4600000	6,62	4	116
A	109	23	6000000	6,9	6	180
A	69	26	160000	6,57		380
A	111	23	5000000	6,62	3	160
A	108	25	4000000	6,93	19	320
A y B	58	24.5	2100000	6,6	3	121
A y B	31	23	23000000	6,89	5	280
A y B	85	24	610000	6,77	3	121
A y B	105	23	120000000	6,8	5	280

B	17	22	135000	6,65	7	80
B	18	25	400000	6,7	10	160
B	19	25	200000	6,36	6	190
B	20	26	4000000	6,66	27	180
B	33	28	520000	6,78	5	158
B	34	28	5000000	6,62	2	300
B	29	26	10000000	6,44	25	380
B	59	22	1600000	6,58	12	120
B	66	27	2020000	6,51	23	350
B	40	26	2010000	6,68	13	160
B	51	26.5	1710000	6,62	4	3000
B	56	22.5	180000	6,64	100	160
B	39	27,5	70000	6,66	7	80
B	43	23	930000	6,66	10	160
B	44	25	1500000	6,6	6	190
B	48	25.5	250000000	6,59	27	180
B	54	24	4100000	6,57	5	158
B	60	26	1200000	6,55	2	300
B	104	23	300000	6,9	25	380
B	83	23	152000	6,61	12	120
B	86	27	296000000	6,43	23	350
B	97	25	1700000	6,67	13	160
B	95	25	330000	6,62	4	300
B	114	20	200000	6,64	100	160
B Y C	28	26	600000	6,78	7	106
B Y C	52	27	900000	6,68	7	106
C	38	24	15100000	6,63	9	270
C	78	22	310000	6,6	28	180
C	68	27,5	400000	6,57	12	240
C	93	25	910000	6,64	9	270
C	88	24	6600000	6,69	28	180
C	107	24	17000000	6,91	12	240
D	21	27	100000	6,83	8	160
D	22	26	500000	6,83	10	250
D	25	27	500000	6,85	4	220
D	57	28	3500000	6,64	6	200
D	62	20	257000000	6,6	8	120
D	64	25	3200000	6,51		70
D	77	28	320000	6,62		120
D	102	24	900000	6,83	4	170
D	112	26	139000	6,66	8	160
D	92	24	800000	6,82	10	250
D	94	24	620000	6,64	4	220

D	100	23	500000	6,89	6	200
D	84	26	600000	6,67	8	120
D	87	26	3100000	6,68		70
D	101	24	100000000	6,86		120
D	113	20	1000000	6,83	4	170

La codificación de las zonas se realizó de la siguiente manera:

A: Leche proveniente del sector de Victoria del Portete

B: Leche proveniente del sector de Tarqui

C: Leche proveniente del sector de Cumbe

D: Leche proveniente del sector de Tutupali

A y B: Leche proveniente del sector de Victoria del Portete y Tarqui

B y C: Leche proveniente del sector de Tarqui y Cumbe

Las Variables usadas en el análisis estadístico se clasifican de la siguiente manera:

Tabla 5. Variables usadas en el análisis estadístico

Variables Independientes cuantitativas	Variables dependientes cuantitativas	Variables independientes cualitativas
Temperatura de la leche al momento del muestreo	UFC/ml	Zona de donde los carros recolectan la leche
pH de la leche a 20 ± 1 °C		
Número de proveedores de los cuales recolectan la leche los carros muestreados		
Litros comercializados/día		

Para determinar la media, moda, valor máximo y mínimo, desviación estándar y la frecuencia de las temperaturas y pH de las muestras de leche tomadas en los carros durante el muestreo se utilizó el programa SPSS. Los resultados se presentan a continuación:

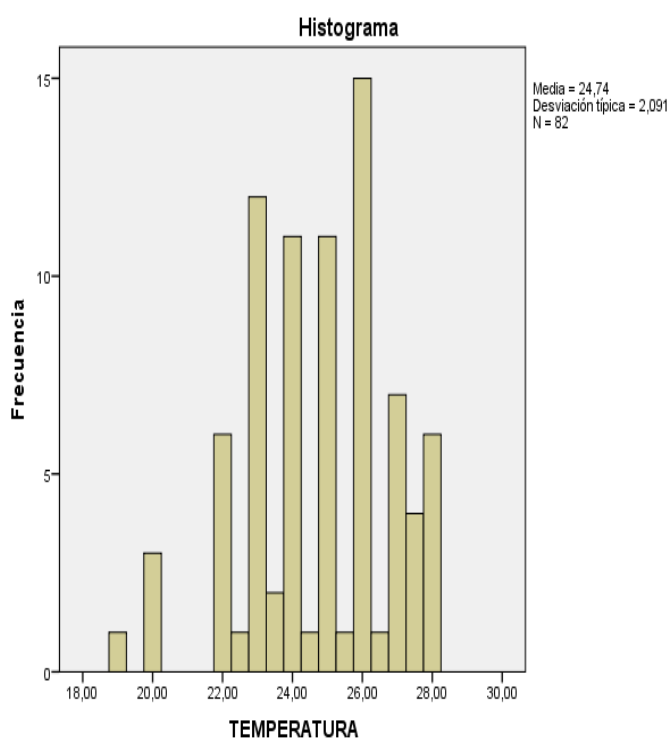
Figura 3. Histograma de Frecuencia de la Temperatura

Tabla 6. Estadísticos de la Temperatura		
TEMPERATURA		
N	Válidos	82
	Perdidos	0
Media		24,7439
Moda		26,00
Desv. típ.		2,09090
Varianza		4,372
Mínimo		19,00
Máximo		28,00

Tabla 7. Frecuencias de la temperatura

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	19,00	1	1,2	1,2	1,2
	20,00	3	3,7	3,7	4,9
	22,00	6	7,3	7,3	12,2
	22,50	1	1,2	1,2	13,4
	23,00	12	14,6	14,6	28,0
	23,50	2	2,4	2,4	30,5
	24,00	11	13,4	13,4	43,9
	24,50	1	1,2	1,2	45,1
	25,00	11	13,4	13,4	58,5
	25,50	1	1,2	1,2	59,8
	26,00	15	18,3	18,3	78,0
	26,50	1	1,2	1,2	79,3
	27,00	7	8,5	8,5	87,8
	27,50	4	4,9	4,9	92,7
	28,00	6	7,3	7,3	100,0
	Total	82	100,0	100,0	

Figura 7. Histograma de Frecuencia del pH

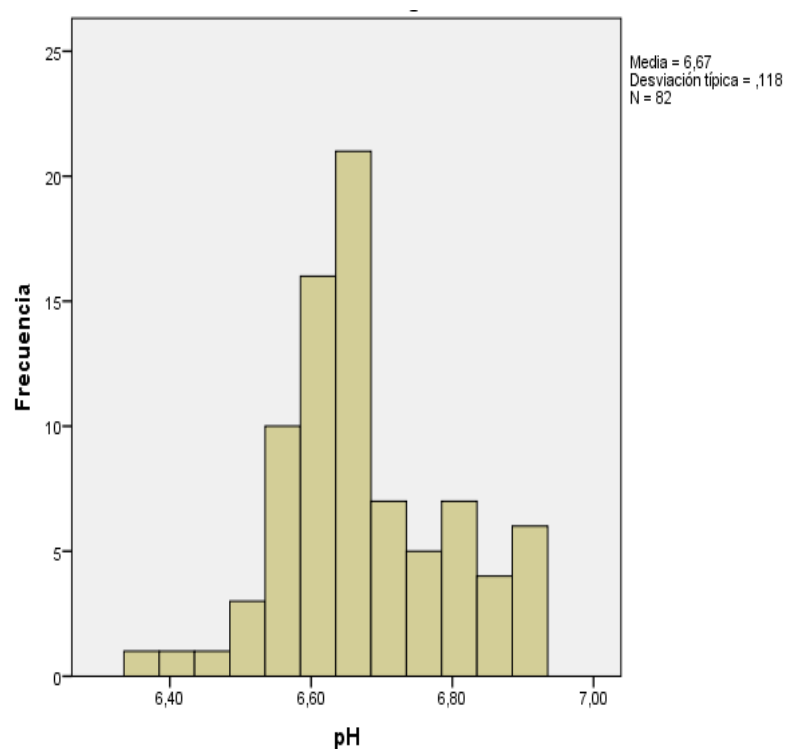


Tabla 8. Estadísticos del pH		
pH		
N	Válidos	82
	Perdidos	0
Media		6,6744
Moda		6,62
Desv. típ.		,11841
Varianza		,014
Mínimo		6,36
Máximo		6,93

Tabla 9. Frecuencias del pH

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	6,36	1	1,2	1,2	1,2
	6,43	1	1,2	1,2	2,4
	6,44	1	1,2	1,2	3,7
	6,51	3	3,7	3,7	7,3
	6,55	4	4,9	4,9	12,2
	6,57	5	6,1	6,1	18,3
	6,58	1	1,2	1,2	19,5
	6,59	1	1,2	1,2	20,7
	6,60	4	4,9	4,9	25,6
	6,61	1	1,2	1,2	26,8
	6,62	8	9,8	9,8	36,6
	6,63	2	2,4	2,4	39,0
	6,64	7	8,5	8,5	47,6
	6,65	4	4,9	4,9	52,4
	6,66	4	4,9	4,9	57,3
	6,67	3	3,7	3,7	61,0
	6,68	3	3,7	3,7	64,6
	6,69	3	3,7	3,7	68,3

Con los datos de la tabla 10 se procedió a hacer en Excel Análisis de Varianza de un factor para verificar el nivel de significancia entre las medias de UFC/ml de cada una de las zonas de recolección de la leche.

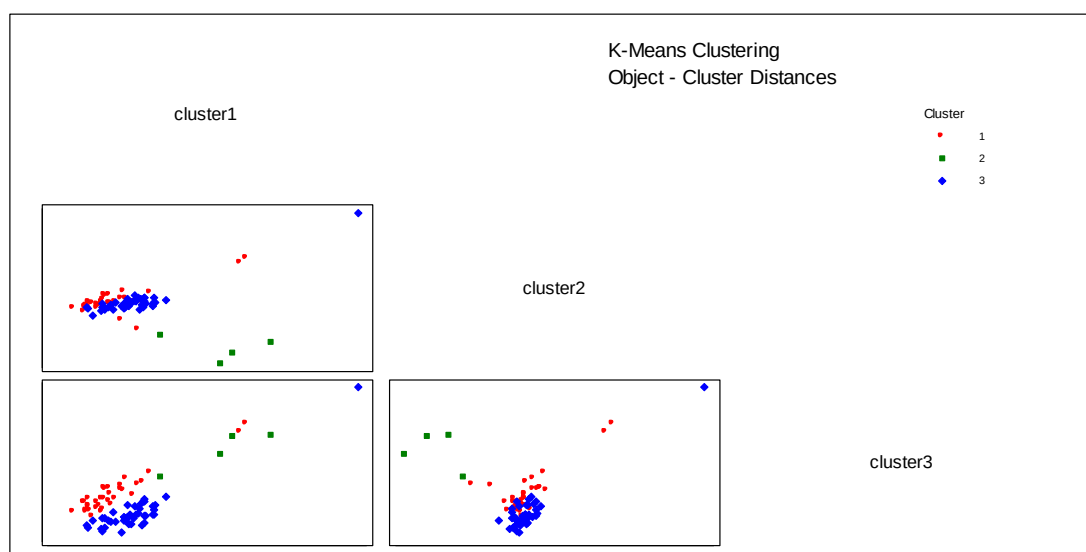
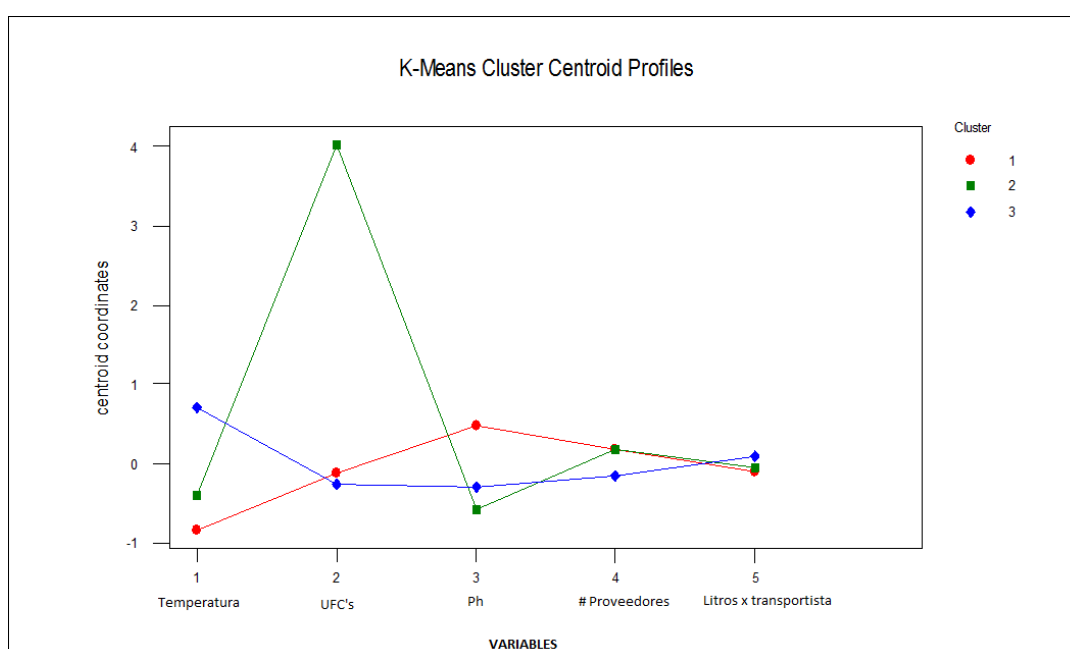
Tabla 11: Varianza de las UFC/ml en las zonas de recolección de la leche

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Zona A	30	184540000	6151333,33	2,7718E+14
Zona A+B	4	145710000	36427500	3,2086E+15
Zona B	24	584257000	24344041,7	5,9162E+15
Zona B+C	2	1500000	750000	4,5E+10
Zona C	6	40320000	6720000	5,8141E+13
Zona D	16	372779000	23298687,5	4,4933E+15

Tabla 12: Análisis de la varianza de un factor de las UFC/ml en las zonas de recolección de la leche

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8,0806E+15	5	1,6161E+15	0,5546952	0,73427774	2,3349196
Dentro de los grupos	2,2143E+17	76	2,9135E+15			
Total	2,2951E+17	81				

Con la base de datos de la Tabla 13 se aplicó a las variables K-means obteniéndose lo siguiente en el programa SCAN:

Figura 5. K-means clustering de las UFC/ml de las muestras de leche**Figura 6 . K-means clustering centroid profiles de UFC/ml de las muestras de leche****Tabla 13. Clasificación de las zonas en 3 clúster de acuerdo a K-means**

Análisis del clúster					
clúster 1		clúster 2		clúster 3	
zona	K-means	zona	K-means	zona	K-means
1	1			1	3
1	1	5	2	1	3

1	1	2	2	1	3
1	1	2	2	1	3
1	1	4	2	1	3
1	1			1	3
1	1			1	3
1	1			1	3
1	1			1	3
1	1			1	3
1	1			1	3
1	1			1	3
1	1			1	3
1	1			5	3
1	1			2	3
1	1			2	3
1	1			2	3
5	1			2	3
5	1			2	3
2	1			2	3
2	1			2	3
2	1			2	3
2	1			2	3
2	1			2	3
2	1			2	3
2	1			2	3
2	1			2	3
3	1			2	3
3	1			2	3
3	1			2	3
4	1			5	3
4	1			5	3
4	1			3	3
4	1			3	3
4	1			3	3
				4	3
				4	3
				4	3
				4	3

				4	3
				4	3
				4	3
				4	3
				4	3
				4	3

Con los datos de la tabla 13 se obtuvo los porcentajes de muestras correspondientes a cada zona de donde fue recolectada la leche para cada uno de los 3 clúster obtenidos por K-means.

Figura 7. Porcentaje de muestras en el clúster 1

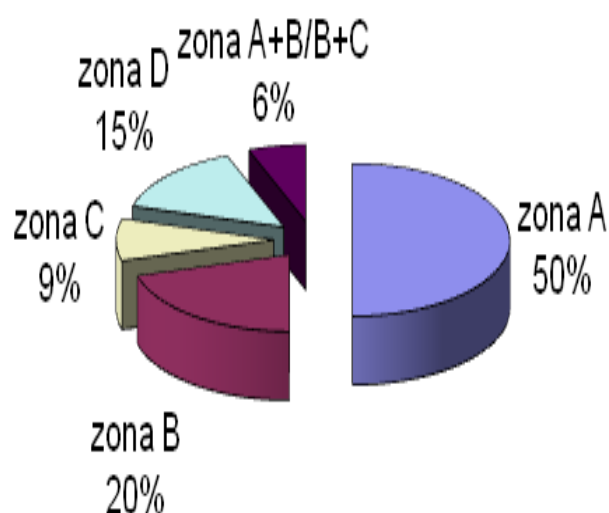


Tabla 14. Número de muestras en el clúster 1	
Origen	Nº Muestras
zona A	17
zona B	7
zona C	3
zona D	5
zona A+B/B+C	2
TOTAL	34

Figura 8. Porcentaje de muestras en el clúster 2

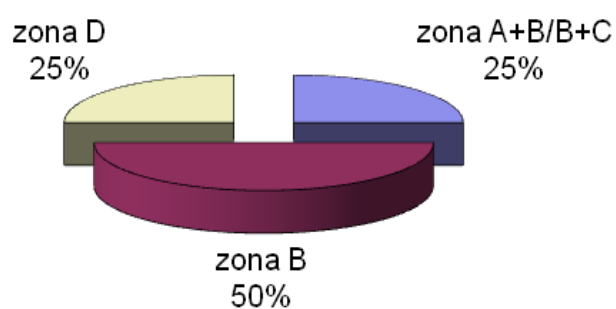


Tabla 15. Número de muestras en el clúster 2	
zona	No Muestras
zona A+B/B+C	1
zona B	2
zona D	1
TOTAL	4

Figura 9. Porcentaje de muestras en el clúster 3

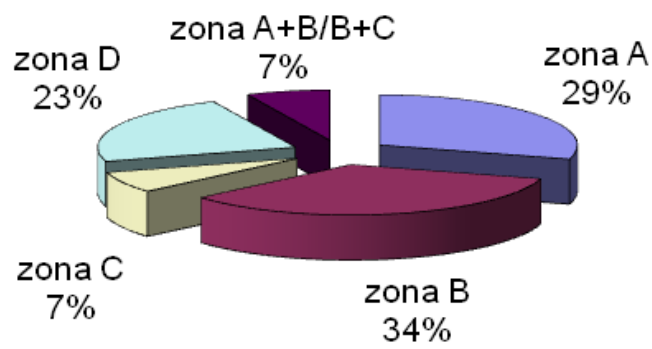


Tabla 16. Número de muestras en el clúster 3	
Origen	No Muestras
zona A	13
zona B	15
zona C	3
zona D	10
zona A+B/B+C	3
TOTAL	44

CAPITULO III

DISCUSION

Un análisis general demuestra que 46 de las 82 muestras se encuentran dentro la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 9:2012 Quinta Revisión para Leche Cruda que exige un máximo de 1500000 UFC/ml de leche; es decir un 56,09% de los carros están dentro de la norma el momento que ingresan a la ciudad a comercializar la leche. El 43,90% transporta leche que no es apta para el consumo humano ya que supera el límite máximo permitido en el artículo 5.1.4 de la mencionada norma.

Los resultados en SPSS indican que los carros transportan la leche a una temperatura promedio de 24,74°C y pH de 6,67. El valor de temperatura que más se repite es 26°C, la menor temperatura medida con el termómetro durante el muestreo es 19°C y la máxima 28°C. En cuanto al pH la tabla 8 indica que el valor que más se repite es 6,62 y el valor mínimo que determinó el potenciómetro fue de 6,36 y el máximo de 6,93.

El pH de la leche es 6.5 a 6.7 y cualquier cambio en éste factor indica adulteración del producto, los pH menores se deben a acidificación microbiana y los mayores a infección de la vaca con mastitis o adulterantes (Badui, 2006)

Es muy probable el uso de adulterantes alcalinos con el fin de evitar que la leche se acidifique ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en el cultivo la leche presenta altas cargas microbianas el momento que inician el recorrido y la mayoría de los carros transportan de 2 – 6 horas la leche sin refrigeración mientras comercializan el producto.

De todos los carros muestreados ninguno tenía un sistema de frío que mantenga la leche a temperatura que inhiba la reproducción de las bacterias, la temperatura ambiente a la que es transportada la leche contribuye a que conforme avanza las horas de recorrido la carga bacteriana vaya aumentando exponencialmente. En éstos casos es recomendable que las personas que manipulan la leche bajo éstas condiciones utilicen un activador del sistema lactoperoxidasa el cual tiene un efecto bacteriostático en la flora mesófila y es de bajo costo y recomendado para países en donde por razones técnicas u económicas no se pueden mantener un sistema de frío; trayendo como ventaja detener el crecimiento microbiano hasta por 8 horas cuando la leche es almacenada a la temperatura ambiente mejorando la inocuidad del producto y beneficios tanto a consumidores como procesadores de leche (Codex Alimentarius CAC-GL-13).

El método de la lactoperoxidasa/tiocianato/peróxido de hidrógeno es un sistema antibacteriano natural presente en la leche y en la saliva humana. La enzima lactoperoxidasa se halla en la leche de bovino y búfalo en concentraciones relativamente elevadas. Puede oxidar los iones de tiocianato en presencia del peróxido de hidrógeno. Esta reacción permite convertir el tiocianato en ácido hipotiocianoso (HOSCN). Con el pH de la leche, el HOSCN se disocia y se presenta principalmente en forma de iones de hipotiocionato (OSCN⁻). Este reacciona específicamente con los grupos sulfhidrilos

libres, inactivando así varias enzimas vitales para el metabolismo bacteriano y, obstaculizando éste y la capacidad reproductora de las bacterias. Como las proteínas de la leche contienen muy pocos grupos sulfhidrilos y los que se hallan presentes son relativamente inaccesibles al OSCN- (enmascarado), la reacción de este compuesto en la leche es bastante específica y combate las bacterias presentes en la leche (Codex Alimentarius CAC-GL-13)

La tabla N° 11 nos indica la varianza entre las zonas de donde se recolecta la leche, en la columna de promedios se puede observar que la zona B y la zona D son las que presentan el promedio más alto de carga microbiana.

La tabla 12 es el resultado del Análisis de la Varianza de una vía realizado en Excel y aplicado a todas las zonas de donde los carros muestreados recolectaban la leche, en la columna de promedios de la tabla 12 se puede observar que el valor Estadístico $F = 0,5546$ es menor que el F crítico con valor de 2,3349 por lo tanto no existe una diferencia significativa entre las zonas, todas están contaminadas; ya que el valor estadístico F debería ser igual o mayor al valor crítico F (2,3349) para que exista una diferencia significativa a un nivel de significancia $\alpha=0,05$ usado en el cálculo del análisis de la varianza.

Para el cálculo del análisis de la varianza se consideró:

- Hipótesis nula (H_0)= No existe diferencia significativa entre las medias del número de UFC/ml de cada una de las zonas de donde se recolecta la leche
- Hipótesis alternativa (H_1) = El número de UFC/ml difieren significativamente de una zona a otra.

En la tabla # 12 se puede observar que el cociente entre la estimación de la varianza entre columnas ($1,6161E+15$) y la estimación de la varianza dentro de las columnas ($2,9135E+15$) es de 0,5546 valor pequeño próximo a 1 por lo que se acepta la hipótesis nula de que las medias de las UFC/ml no presentan variación entre las zonas de donde se recolecta la leche.

Otra forma de llegar a la misma conclusión es que el valor de la probabilidad = 0.7342 en la tabla # 12 es mayor al nivel de significancia utilizado igual a 0,05 por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

En el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se estima la flora total, pero sin especificar gérmenes. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración (Pascual M., Calderón V., 2000). Las condiciones bajo las cuales se está manipulando la leche reflejan la elevada carga

microbiana de la leche en las primeras horas luego del ordeño, además durante el conteo de bacterias en las placas petri se presentó el inconveniente de un gran número de levaduras que dificultaban el conteo de las bacterias, conforme incrementaba la dilución mayor era la presencia de levaduras; en las placas con dilución 1×10^{-7} la gran mayoría estaban totalmente colonizadas de levaduras.

Con los datos de la tabla 4 se realiza otro estudio en el programa SCAN en donde se utiliza 5 variables: Temperatura, UFC, pH, # proveedores y litros que transporta diariamente los carros muestreados. Se aplica la técnica multivariante de K-Means Clustering para el cálculo del algoritmo se escoge en las opciones del programa que los datos se agrupen en 3 clúster y para el cálculo de la distancia entre las medias se escoge la distancia euclidiana.

La figura 5 es una representación gráfica de la distribución en el espacio de cómo las variables se agrupan en los 3 clúster, los ejes representan la distancia desde el centroide al clúster correspondiente.

La figura 6 muestra los perfiles de los centroides de cada uno de los 3 clúster; es decir, los valores de las 5 variables originales con las observaciones asignadas a cada uno, este gráfico nos provee un análisis cualitativo el cual se describe a continuación.

En el clúster 1 representado por la línea roja se observa que la temperatura es la más baja respecto de los otros 2 clúster, la cantidad de UFC es menor que el clúster 2 y ligeramente superior al clúster 3, el pH presenta el valor más alto de todos los grupos por lo tanto no existe correlación entre el número de UFC y el pH, el número de proveedores es exactamente igual al clúster 2 y la última variable que es los litros que transportan cada uno de los carros es igual con el clúster 2 y muy cercano al clúster 3.

En el clúster 2 representado por la línea verde la temperatura tiene un valor intermedio entre el clúster 1 y 3, por el contrario el número de colonias se presenta totalmente alejado del resto con un valor sumamente alto lo que genera un pico muy marcado, el pH tiene el menor valor de los 3 grupos; en este caso si existe una correlación inversa entre el número de UFC y el pH que al ser el más bajo de todos los clúster es el grupo más contaminado al tener el mayor número de UFC. Como ya se mencionó el número de proveedores es igual al clúster 1 y el volumen de leche que transporta diariamente no presenta variación con el clúster 1.

En el clúster 3 representado por la línea azul la temperatura presenta el valor más alto de los 3 grupos, mientras que el número de UFC es el más bajo en este grupo. No existe correlación entre la temperatura y las UFC pues a mayor temperatura debería ser mayor el número UFC, el pH del clúster 3 tiene un valor ligeramente más elevado al clúster 2 pero es inferior al clúster 1, el número de proveedores es inferior a los dos grupos y finalmente los litros que transportan es similar al clúster 1 y 2.

Únicamente en el clúster #2 el mismo que tiene el menor número de muestras presenta correlación inversa entre los UFC y el pH, en los otros dos clúster no hay correlación. Resultados contradictorios ya que para cargas elevadas de bacterias el pH tiende a disminuir por el ácido láctico producto del metabolismo aerobio de las bacterias. Las muestras presenta pH promedio de 6,67 y el valor que más se repite es 6,62 la razón de los valores elevados en el pH puede ser debido a la presencia de adulterantes alcalinos en la leche que son adicionados para evitar la acidificación de la misma durante el tiempo que los carros comercializan el producto.

Además en éste gráfico se puede observar que las variables independientes cuantitativas: # proveedores y litros por transportista en los 3 clúster tienen el mismo comportamiento.

En la tabla 13 se encuentra el detalle de la zona y el clúster al que fue asignado por el algoritmo K-means aquí se puede observar que el clúster tres es el que tiene el mayor número de datos, seguido del clúster uno y finalmente el clúster dos con cuatro datos únicamente. Clasificándolos en porcentajes a cada uno de los clúster tenemos:

Figura 7 y tabla 14: el 50% del clúster 1 está formado por muestras tomadas de los carros que recolectan la leche del sector A que corresponde a Victoria del Portete y el 50% restante corresponde a muestras del sector de Tarqui (20%), Cumbe (9%), Tutupali (15%) y el 6% restante son carros que recolectan la leche de dos sectores Victoria del Portete y Tarqui (A+B) y de Tarqui y Cumbe(B+C).

Figura 8 y tabla 15: el 50% del clúster 2 está formado por muestras de los carros que recolectan la leche del sector de Tarqui, el 25% de leche que viene del sector de Tutupali y el 25% restante son carros que recolectan la leche de dos zonas la primera Victoria del Portete y Tarqui y la segunda Tarqui y Cumbe. Hay que destacar que el clúster 2 está formado únicamente por 4 muestras así que el 50% del clúster sólo lo conforman 2 muestras, a pesar de tener pocos datos éste es el clúster que tiene los valores con la más alta cantidad de UFC/ml como se puede apreciar en la figura 6.

Figura 9 y tabla 16: es un clúster más heterogéneo respecto de los anteriores, el 34% está formado por muestras de la zona de Tarqui, el 29 % por muestras de la zona de Victoria del Portete, el 23% de la zona de Tutupali, 7% de la zona de Cumbe y el 7% restante carros que recolectan la leche de dos sectores Victoria del Portete y Tarqui y de Tarqui y Cumbe.

CONCLUSIONES

- De los 82 carros muestreados 46 presentan valores inferiores a $1,5 \times 10^6$ UFC/ml de leche es decir el 56,09%, la diferencia que es el 43,90% restante superan el límite máximo de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN: 2012 Leche Cruda por lo que no se considera leche apta para el consumo humano.
- Todas las zonas de donde es recolectada la leche presentan elevada carga microbiana pero los sectores de Tarqui y Tutupali presentaron el mayor número de UFC/ml.
- De acuerdo a los resultados del ANOVA no hay diferencia significativa entre las medias de las UFC/ml de las zonas de donde es recolectada la leche.
- Los carros muestreados transportan la leche sin un sistema de frío, la temperatura promedio de los carros es $24,74^{\circ}\text{C}$ pero la leche que proviene de Tarqui presenta los valores más elevados de temperatura.
- Todos los carros muestreados no transportan la leche en condiciones de temperatura que inhiba el crecimiento bacteriano durante las horas que recorren la ciudad comercializando el producto.
- La carga microbiana elevada en los carros muestreados no es reflejada en los valores de pH. El valor promedio de pH es 6.67.
- Es necesario el uso de un activador de la lactoperoxidasa para inhibir el crecimiento de la flora mesófila durante la comercialización de la leche en la ciudad en carros que no pueden acoplar un sistema de frío.
- El uso del sistema activador de lactoperoxidasa en la leche no se debe considerar como un sustituto de la pasteurización.
- Presencia de levaduras que refleja las malas condiciones de higiene, en la mayoría de muestras. En la mayoría de las placas de diluciones de 10^{-7} estaban totalmente colonizadas de levaduras.
- La leche que se comercializa en la ciudad de Cuenca en carros no debería ser consumida cruda; es necesario un tratamiento térmico previo al consumo de la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ✓ Adams M.; Moss, O. (2005). *Microbiología de Alimentos*. XX Edición. Editorial. Acibia. S.A. Zaragoza España. 130-263p
- ✓ Badui S. (2006) .*Química de los Alimentos*. IV Edición. Editorial Pearson Educación. Calpan de Juarez, Edo de México. 603-629p
- ✓ Bath D.; et al (1984). *Ganado lechero principios, prácticas, problemas y beneficios*. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México D.F. 1984
- ✓ Burrows W. (1974). *Tratado de Microbiología*. XX Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. México D.F. 76-81, 256-259p
- ✓ Caballero A. (2008). *Temas de Higiene de los Alimentos*. Editorial Ciencias Médicas. La Habana . 216-232
- ✓ Cuellar A. (2008). *Ciencias Tecnología e Industria de Alimentos*. I Edición Grupo Latino Editores. Bogotá Colombia. 805-905p
- ✓ ICMSF. (2002) *Microorganismos en los Alimentos. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*. Ordoñez J. et. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza España. 278p
- ✓ INEN. Control Microbiológico de los Alimentos . Preparación de los medios de cultivo y reactivos. NTE.INEN:1529-1.Primer Edición. Quito-Ecuador:1999
- ✓ INEN. Control Microbiológico de los Alimentos . Envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. NTE.INEN:1529-2.Primer Edición. Quito-Ecuador:1999
- ✓ INEN. Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos Aerobios mesófilos .REP. NTE.INEN:1529-5:2006.Primer Revisión. Quito:2006
- ✓ INEN .Leche y Productos Lácteos . Determinación de bacterias aerobias. Rep. NTE.INEN 734:1984. Primera Revisión. Quito: 1984
- ✓ INEN. Leche y productos Lácteos. Muestreo. NTE.INEN 4. Primera Revisión. Quito:1984
- ✓ Levin R.; Rubin D. (2004) .*Estadística para Administración y Economía*. VII Edición. Editorial Pearson Educación Inc. México. 58-170, 468-501p
- ✓ Madigan M.; Martinko J.; Parker J. *Brock. Biología de los Microorganismos*. X Edición. Editorial Pearson Prentice Hall 103-129p
- ✓ Martinez C. (1984) *Muestreo. Algunos métodos y sus aplicaciones prácticas*. ECOE Ediciones. Bogotá Colombia. 9-26p
- ✓ Montgomery R. *Bioquímica Casos y Textos*. VI Edición Editorial Harcourt Brace de España S.A. Madrid España. 151-165p
- ✓ Newbold P.; Carlson W., Thorne B.(2008), *Estadística para Administración y Economía*. Editorial Pearson. Madrid-España. 929p

- ✓ Pascual M., Calderón V. (2000). *Microbiología Alimentaria, Metodología analítica para alimentos y bebidas*. II Edición. Edita Díaz de Santos S.A. Madrid España. 3-15p
- ✓ Perez C. (2009) *Técnicas de análisis de datos con SPSS 15*. Editorial Pearson Educación. S.A. Madrid-España. 557-593p
- ✓ Stanchi O. et al. (2007) *Microbiología Veterinaria*. I Edición. Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. Buenos Aires- Argentina. 25-29, 258-273p
- ✓ Todeschini R. (1995) *Introduzione alla Chemiometria*. Dipartimento di Scienze dell ambiente del territorio Università degli studi di milano. Capitolo III
- ✓ Valle P., Florentino B. (2000). *Toxicología de Alimentos*. Instituto Nacional de Salud Pública y Centro Nacional de Salud Ambiental México, D.F. 56-63p

REFERENCIAS ELECTRONICAS

- ✓ Celis M.; Juarez D. (2009). *Microbiología de la leche*. [en línea] Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional. Disponible en http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_microb_09/microbiologia_leche.pdf > (consultado: el 16 marzo 2013)

- ✓ Codex Alimentarius. Directrices para la conservación de la Leche Cruda Mediante la Aplicación del Sistema de Lactoperoxidasa. CAC-GL-13.1991. [en línea]. Disponible en http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lista-de-las-normas/es/?no_cache=1 > (consulta: 20 marzo 2013)

- ✓ Ergomix. *Buenas Prácticas de Ordeño y la Calidad higiénica de la leche en Ecuador* [en línea] Disponible < <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/manejo/articulos/buenas-practicas-ordeno-calidad-t4758/124-p0.htm> > (consultado: el 22 marzo 2013)

- ✓ Hernandez A. (2003) *Microbiología Industrial*. I Edición. Editorial Universidad Estatal a distancia. San José Costa Rica. [en línea]. Disponible en web < <http://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PR6&lpg=PR6&dq=Hernandez+Alicia+.+Microbiología+Industrial> > (consulta :8 marzo 2013)

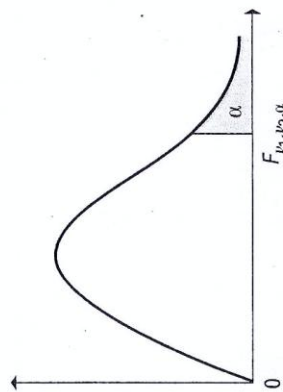
- ✓ Pinto C., Manuel, Carrasco R., Erwin, Fraser L., Bernardo et al. *Composición química de la leche cruda y sus variaciones a nivel de silos en plantas lecheras de la viii, ix y x regiones de chile. parte i. macrocomponentes. Agro sur*. [en línea]. jul. 1998, vol.26, no.2 [citado 05 Marzo 2013], p.97-109. Disponible en la World Wide Web: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-88021998000200010&lng=es&nrm=iso. ISSN 0304-8802.

- ✓ Salvador Figueras, M (2000) *Introducción al Análisis Multivariante* [en línea]. 5 campus.com, Estadística. Disponible <http://www.ciberconta.unizar.es/leccion/anamul/> > (consulta: 5 agosto 2013)

- ✓ Shafiei, Y., Razavilar, V. and Javadi, A. (2011). *Thermal Death Time of Staphylococcus Aureus (PTCC=29213) and Staphylococcus Epidermidis (PTCC=1435) in Distilled Water*. [en línea]. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, (consultado:27 marzo 2013).Disponible en <http://www.ajbasweb.com/ajbas/2011/November-2011/1551-1554.pdf> >

ANEXOS

TABLA CON LOS VALORES DE F PARA DISTRIBUCIONES F CON 0.05 DEL AREA EN EL EXTRECHO. Fuente: Newbold P.; Carlson W.; Thorne B., 2008



Las tablas muestran, para las probabilidades $\alpha = .05$ y $\alpha = .01$, los valores de $F_{\nu_1, \nu_2, \alpha}$ tales que $P(F_{\nu_1, \nu_2} > F_{\nu_1, \nu_2, \alpha}) = \alpha$, donde F_{ν_1, ν_2} es una variable aleatoria F con ν_1 grados de libertad en el numerador y ν_2 grados de libertad en el denominador. Por ejemplo, la probabilidad de que una variable $F_{3,7}$ sea mayor que 4.35 es .05.

$\alpha = .05$

DENOMINADOR ν_2	NUMERADOR ν_1																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.62	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88

Tabla 9. Puntos de corte de la distribución F (continuación).

DENOMINADOR ν_2	$\alpha = .05$																		
	NUMERADOR ν_1																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.67	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.58	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00